

## 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻  
平成15年度博士課程 進学  
氏名 岡井 公彦  
指導教員名 田之倉 優

## 論文題目

好酸性好熱菌 *Sulfolobus tokodaii* strain 7 由来 short-chain flavin reductase HpaC  
及びNAD<sup>+</sup>、NADP<sup>+</sup>複合体のX線結晶構造解析

### 1. 背景

*Sulfolobus tokodaii* strain 7 は大分県別府温泉から採取された、単独で硫化水素を分解する特徴を有した好気性、好酸性の好熱菌である。生産されるタンパク質は耐熱性を有する優れた特徴があり、化学、食品、医薬品など産業分野への応用が期待される。

short-chain flavin reductase ファミリーはフラビン還元酵素の中で近年、報告されてきた新しいファミリーである。HpaC はこの short-chain flavin reductase ファミリーのタンパク質でNADH 依存的にフラビンを還元する。HpaC はFAD を還元し、還元されたFADはHpaB に渡されて4-HPA を3,4-dihydroxyphenylacetate (3,4-DHPA) にする反応に用いられる。HpaC とHpaB が関わる反応は4-HPA 代謝反応における最初のステップである。4-HPA は芳香族アミノ酸や植物成分の発酵物質であり、4-HPA を炭素源、エネルギー源として使うバクテリアが存在することが明らかになっている。本研究では *Sulfolobus tokodaii* strain 7 由来のHpaC の構造解析を行い、FMN とNAD(P)H の結合サイト周辺の環境、フラビンの選択性、NAD(P)H の基質特異性についての知見を得た。

### 2. 全体構造

HpaCの構造はSAD ( Single-wavelength anomalous dispersion ) 法により2.3 Åで決定した。HpaCモノマーは12本のβストランド、3つのαヘリックス、2つの<sub>3</sub>10ヘリックスより

成り、中央の7本の $\beta$ ストランドから成るバレルが $\alpha_2$ ヘリックスにキャッピングされる構造をとっていた。HpaCはダイマーとして存在しており、これは溶液中での存在状態の結果と同じであった。ダイマーインターフェイスはお互いの $\alpha_1$ ヘリックス、 $\beta_1$ 、 $\beta_4$ 、 $\beta_5$ 、 $\beta_9$ 、 $\beta_{10}$ 、 $\beta_{11}$ 、 $\beta_{12}$ ストランドにあるアミノ酸の密接な相互作用によって安定化していた。NAD<sup>+</sup>、NADP<sup>+</sup>複合体の構造は、結晶にNADH、NADPHをソーキングした後に回折データを取得し、

それぞれ 1.70 Å、2.05 Å で決定した(図1)。複合体の構造はNAD(P)<sup>+</sup>を結合していないNative構造とほぼ同じであったが、N末端ヘリックスで最も違いが見られた。NAD(P)<sup>+</sup>複合体ではN末端ヘリックスがNative構造に比べてタンパク質内部に20°程度折れ曲がり基質であるNAD(P)<sup>+</sup>との距離が縮まっていた。

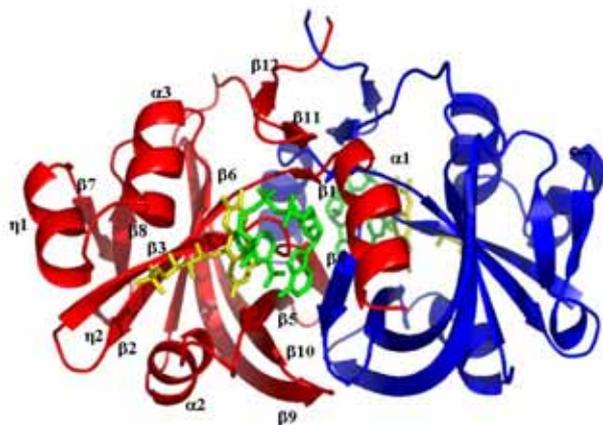


図1 NAD<sup>+</sup>複合体の結晶構造

### 3. FMN結合サイト

HpaCの結晶はフラビン化合物を添加しなくても黄色の色がついており、構造解析の結果からFMNを結合していることが明らかになった。FMNはダイマーインターフェイス近傍の $\alpha_2$ 、 $\alpha_3$ 、 $\eta_1$ ヘリックス、 $\beta_3$ 、 $\beta_5$ 、 $\beta_{11}$ ストランドに囲まれたポケットに結合していた。FMNのイソアロキサジン環の*si*-faceがタンパク質の内部に向けて基質の結合が不可能であったのに対し、*re*-faceは完全に活性ポケットの方を向いていた。このことから反応は*re*-faceで行われることが明らかになった。結合していたFMNは11の水素結合といくつかの疎水結合により安定化されていた。水素結合しているアミノ酸の大部分はホモログのタンパク質で保存されていないことが明らかになった。

HpaCは同じshort-chain flavin reductaseファミリーのPheA2と似た全体構造をとっていたが、PheA2ではFADが結合している。HpaCとPheA2の重ね合わせより $\alpha_3$ ヘリックスと $\eta_1$ ヘリックス間のループ及び、それに続く $\eta_1$ ヘリックスでHpaCのほうがよりフラビンの近くに位置していることが分かった。このため、HpaCではFADのAMPの部分を収容するための十分な空間が存在しておらず、この領域の位置がFMNとFADのどちらと強く相互作用するかを決めていると考えられる。

### 4. NAD<sup>±</sup>結合サイト

HpaCの結晶に過剰量のNADHを添加することで黄色が消えたことから、結晶中でFMNの還元反応が起きていることが分かった。NAD<sup>+</sup>はFMN、 $\alpha 1$ ヘリックス、 $\beta 1$ 、 $\beta 5$ 、 $\beta 11$ 、 $\beta 12$ -ストランドとダイマーのもう片方の $\beta 4$ ストランドで囲まれたクレフトに結合しており、6つのアミノ酸といくつかの水分子と水素結合していた(図2)。NAD<sup>+</sup>のニコチンアミドはFMNのイソアロキサジン環と平行に並んでおり、ニコチンアミドのC4原子とイソアロキサジン環のN5原子の距離が3.4 ÅであることからNADHからFMNへのハイドライドイオンの転移は十分に起こりうることが明らかになった。結合したNAD<sup>+</sup>はニコチンアミドとアデニンがほぼ平行に並んだ非常にコンパクトな構造をとっていた。NAD(P)<sup>+</sup>のコンパクトの度合を表すアデニンのC6原子とニコチンアミドのC2原子の距離は4.2 Åであり、現在までに解かれているNAD(P)<sup>+</sup>の中で最も折りたたまれたものの1つであった。HpaCのNAD<sup>+</sup>はホモロ

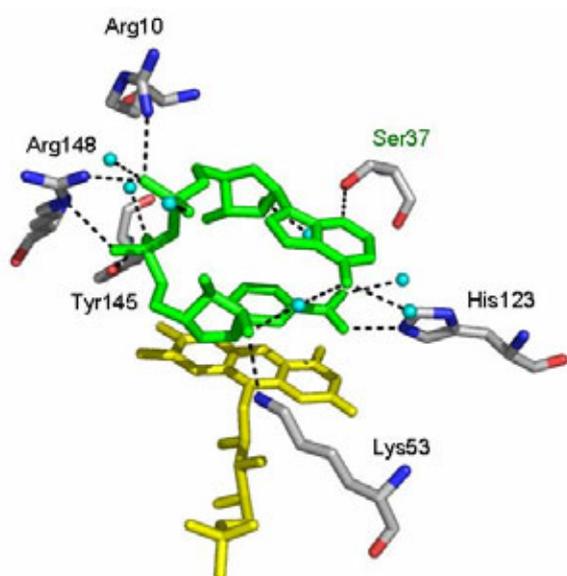


図2 NAD<sup>+</sup>とその周辺残基

グであるFeR (ferric reductase) のNADP<sup>+</sup>とは構造が異なっていた。FeRではアデニンが $3_{10}$ ヘリックスとC末端の $\alpha 3$ ヘリックスの間に位置していたのに対し、HpaCではアデニンはN末端ヘリックスとニコチンアミドに位置していた。HpaCのNAD<sup>+</sup>はPheA2のNAD<sup>+</sup>とよく似た構造をとっていたことからNAD<sup>+</sup>のコンパクトな構造はshort-chain flavin reductaseファミリーに特有なものであることが示唆された。

## 5. NADP<sup>+</sup>結合サイト

HpaCはNADH依存的にフラビンを還元する酵素であるが、NADP<sup>+</sup>複合体の構造も解くことに成功した。NADP<sup>+</sup>はNAD<sup>+</sup>と同様に結合ポケットに入っていたが、NAD<sup>+</sup>とは逆の向きで結合していることが分かった(図3)。NAD<sup>+</sup>複合体構造ではニコチンアミドのC4原子とイソアロキサジン環のN5原子の距離が3.4 Åであったのに対し、NADP<sup>+</sup>複合体構造ではこの2原子の距離が7.8 Åであった。このNADP<sup>+</sup>の結合ではハイドライドイオンの転移は起こりづらく、NAD(P)<sup>+</sup>の結合様式の違いがNADH依存性に影響を与えていると考えられる。また、NADP<sup>+</sup>とNAD<sup>+</sup>は同じアミノ酸と相互作用しており、アミノ酸の位置にほとんど変化は見られなかった。このことからHpaCはNAD(P)Hのアデニンとニコチンアミドとを区別して相互作用しているわけではないことが示唆された。

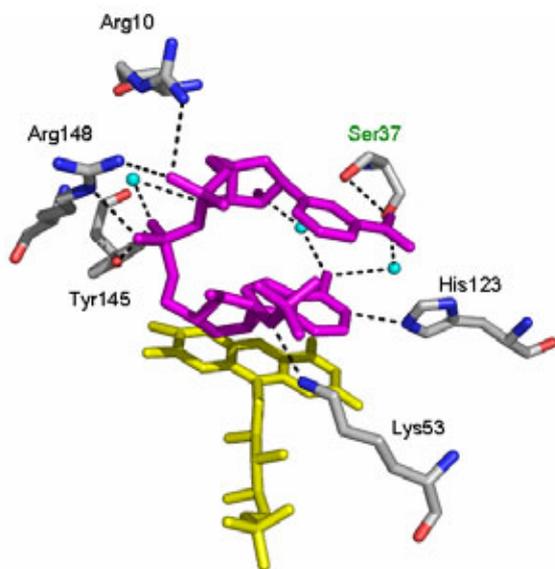


図3 NADP+とその周辺残基

## 6. フラビン還元活性

HpaC の定常状態でのフラビン還元活性の測定をおこなった。FMN を第二基質としたところ、NADPH 活性は NADH の約 5% の活性しか持たなかった。また、フラビン化合物（電子受容体）としてリボフラビン、FAD、FMN の 3 種類を使い、測定をおこなったところ（電子供与体は NADH）FMN が基質として最も活性があり、FAD やリボフラビンも基質として機能した。これは *E. coli* 由来 HpaC の活性測定の結果と同様の傾向を示していた。

## 7. まとめ

*Sulfolobus tokodaii* strain 7 由来 short-chain flavin reductase HpaC の構造解析を 3 状態（Native、NAD<sup>+</sup>複合体、NADP<sup>+</sup>複合体）について行った。その結果、FMN を優先的に結合すること、NADH と NADPH のいずれもが結合し、結合の向きは反対向きになること、結合様式の違いが NADH 依存性に影響を与えていることが明らかになった。